

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI VEGF DAN
VEGFR-1 DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA
PADA JARINGAN INTERSTITIAL TESTIS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Oleh :
ESTI LUTFI OKTAVIANI
145130101111078



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI VEGF DAN
VEGFR-1 DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA
PADA JARINGAN INTERSTITIAL TESTIS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
ESTI LUTFI OKTAVIANI
145130101111078



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI VEGF DAN
VEGFR-1 DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA
PADA JARINGAN INTERSTITIAL TESTIS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

Oleh:

ESTI LUTFI OKTAVIANI

145130101111078

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Juni 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed

NIP. 19770131 200501 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Esti Lutfi Oktaviani

NIM : 145130101111078

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi VEGF dan VEGFR-1 dengan Metode Imunohistokimia pada Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2018
Yang menyatakan,

Esti Lutfi Oktaviani
NIM. 145130101111078

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi VEGF dan VEGFR-1 dengan Metode Imunohistokimia pada Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

ABSTRAK

Proses penuaan (senilitas) keadaan fisiologis yang akan dialami semua makhluk hidup. Penuaan dapat menurunkan produksi hormon testosteron dan produksi estrogen yang dimediasi oleh Estrogen reseptor sehingga dapat menurunkan ekspresi VEGF dan diikuti VEGFR-1. Ekstra etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung senyawa fitosterol yang berfungsi sebagai profertilitas untuk meningkatkan ekspresi VEGF dan VEGFR-1 sebagai penanda angiogenesis untuk menghantarkan hormon dan nutrisi pada testis. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* (SD) berusia 2 tahun dengan berat badan 300 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu : kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 300 mg/kg BB. Parameter yang diukur adalah ekspresi VEGF dan VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis yang diwarnai dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan dianalisis secara statistik dengan one-way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) pada tikus jantan usia tua secara signifikan dengan $\alpha=0,05$ dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan VEGFR-1 dengan dosis efektif 200 mg/kg BB. Kesimpulan penelitian ini ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan VEGFR-1 pada interstitial sel testis.

Kata kunci : Penuaan, Ekstrak etanol *Centella asiatica*, VEGF, VEGFR-1, Testis.

The Potency of Extract Pegagan (*Centella asiatica*) to Expression of VEGF and VEGFR-1 on Old Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

The aging process (senility) is a physiologic condition happens in all living creature. Aging could decrease the production of testosterone and estrogen hormone mediated by estrogen receptor that could decrease VEGF and followed by VEGFR-1 expression. The ethanol extract of extract pegagan (*Centella asiatica*) contains phytosterol compound which has a function as profertility to increase VEGF and VEGFR-1 expression as marker of angiogenesis to deliver nutrition and hormone to the testicles. This study used 2 years old male of Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) weigh 300 gram that were divided into 5 groups: negative control group, positive control group, the group that was given 1 mL of ethanol extract of *Centella asiatica* with dose of 100 mg/kg BW and the group that was given 1 mL of ethanol extract of *Centella asiatica* with dose of 300 mg/kg BW. Parameters that were measured include VEGF and VEGFR-1 expression in interstitial tissue of testicles, stained by Immunohistochemistry method and was analyzed statistically with one-way ANOVA method. The results showed that Gotu Kola (*Centella asiatica*) ethanol extract given to the old male rats significantly with $\alpha=0,05$ could increase VEGF and VEGFR-1 expression with the effective dose of 200 mg/kg BW. The conclusion of this study was extract pegagan (*Centella asiatica*) could increase VEGF and VEGFR-1 expression in interstitial tissue of testicles.

Key Words: Aging, *Centella asiatica* ethanol extract, VEGF, VEGFR-1, Testicles.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi VEGF dan VEGFR-1 Dengan Metode Imunohistokimia pada Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan laporan ini.
2. Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan laporan ini.
3. drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet selaku dosen penguji I yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. drh. Yudit Oktanella, M.Si dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Keluarga penulis, Ayah Udang Septembri Astono, Ibu Sriwidiati, Adik Brian Rafif Suryana dan Adik Daffa Afrizal Albar, yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi serta perhatiannya akan kebutuhan saya baik secara moril maupun materi.

6. Teman sejawat dalam pelaksanaan penelitian ini “Risalia, Ganang, Aldi, Deden dan Bay” yang bekerjasama dengan baik, serta selalu memberikan dukungan yang tak henti-henti.
7. Teman-teman Deer (2014 D) yang selalu mendukung penulis dalam menyelesaikan proposal ini.
8. Teman-teman sepermainan “Tobat-tobat” Risalia, Nur Haya, Citra, Windy, Merry, dan Luica yang selalu memberikan motivasi, mengibur dan memberikan semangat dalam menyelesaikan proposal ini.
9. Teman-teman Walda Tsania, Adeka Yunanza, M. Khoirul Wahid, Dion Santanu Murti yang selalu menyemangati dalam menyelesaikan proposal ini.
10. Rekan-rekan UBE (*Universitas Brawijaya Equinary*) yang selalu memberikan semangat dan keceriaan dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Keluarga Asisten Embriologi Veteriner FKH UB yang telah memberikan semangat serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
12. Keluarga Asisten Reproduksi Veteriner FKH UB yang telah memberikan semangat serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
13. Segenap keluarga “AVENGERS” angkatan 2014 FKH UB atas dukungan serta semangat yang tiada henti.
14. Jajaran petugas administrasi FKH UB yang telah meluangkan waktunya untuk melayani mahasiswa selama proses ujian skripsi.

Akhir kata, penulis berharap semoga ALLAH S.W.T. membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ASTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Masalah	4
1.5 Manfaat Masalah	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penuaan (Senilitas)	6
2.2 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	8
2.3 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
2.4 VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	15
2.5 VEGFR-1 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1</i>)	17
2.6 Testis	19
2.6.1 Spermatogenesis	21
2.6.2 Peran Hormon pada Spermatogenesis	23
2.6.3 Gangguan Reproduksi Hewan Usia Tua	25
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.1 Kerangka Konseptual	28
3.1 Hipotesis Penelitian	31
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	32
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2 Alat dan Bahan penelitian	32
4.2.1 Alat Penelitian	32
4.2.2 Bahan Penelitian	33
4.3 Tahapan Penelitian	33

4.3.1 Rancangan Penelitian.....	33
4.3.2 Sampel Penelitian.....	34
4.3.3 Variabel Penelitian.....	34
4.3.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan.....	34
4.3.5 Pemberian Ekstrak Etnol Pegagan	35
4.3.6 Pengambilan Sampel Organ Testis	35
4.3.7 Analisis Ekspresi VEGF dan VEGFR-1	36
4.3.8 Analisa Data.....	39
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Ekspresi VEGF Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Usia Tua.....	40
5.2 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Ekspresi VEGFR-1 Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Usia Tua.....	49
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	57
6.1 Kesimpulan.....	57
6.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan.....	11
2.2. Data Biologi Tikus	15
4.1 Rancangan Penelitian	33
5.1 Hasil Uji <i>Tukey</i> Ekspresi VEGF Jaringan Interstitial Testis.....	42
5.2 Hasil Uji <i>Tukey</i> Ekspresi VEGFR-1 Jaringan Interstitial Testis.....	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	9
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur <i>Sprague Dawley</i>	14
2.3 Anatomi Testis	19
2.4 Penampang Histologi Sel Leydig dan Sel Sertoli	21
2.5 Proses Pembentukan Sperma	22
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
5.1 Hasil Imunohistokimia VEGF Jaringan Interstitial Testis	41
5.2 Hasil Imunohistokimia VEGFR-1 Jaringan Interstitial Testis	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian	63
2. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	64
3. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	65
4. Pembuatan Preparat Histologis Testis	67
5. Metode Imunohistokimia	68
6. Sertifikat Laik Etik Penelitian	69
7. Determinasi Tanaman Pegagan	70
8. Hasil Uji Statistika VEGF	71
9. Hasil Uji Statistika VEGFR-1	74



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

μL	: mikroliter
ABP	: <i>Androgen Binding Receptor</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AR	: Androgen Reseptor
BB	: Berat Badan
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
E2	: Estradiol
ER	: Estrogen Reseptor
ERE	: Estrogen Reseptor Elemen
g	: gram
IHK	: Imunohistokimia
kg	: kilogram
KN	: Kontrol Negatif
KP	: Kontrol Positif
mg	: miligram
mL	: mililiter
NaCl	: <i>Sodium Chloride</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Polysaturated Fatty Acids</i>
PO	: Per Oral
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	: <i>Sparague Dawley</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Science</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-1	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Proses menua (senilitas) merupakan akumulasi perubahan progresif seiring waktu yang berhubungan dengan peningkatan kerentanan terhadap penyakit dan kematian. Penuaan dapat menurunkan produksi hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen (Pangkahila, 2007). Estrogen memiliki peran penting dalam memastikan fungsi dari traktus reproduktif jantan berfungsi baik. Pada jantan, estrogen yang aktif secara biologis adalah Estradiol. Sumber utama dari hormon Estradiol itu berasal dari proses aromatisasi dari testosteron (Bagget, 1959 dalam Myles dkk., 2017). Estrogen dimediasi oleh aktivasi 2 reseptor spesifik (estrogen reseptor [ER]) pada sel target, ER α , dan ER β , sehingga penurunan produksi estrogen mengakibatkan penurunan estrogen reseptor. Dalam hal ini estrogen berperan dalam meregulasi aktivasi dari VEGF dan reseptornya VEGFR-1 yang merupakan faktor penting dalam angiogenesis dan permeabilitas (Cross *et al.*, 2003).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan faktor angiogenik yang merupakan faktor penting dalam angiogenesis. VEGF sebagai *growth factor* yang memiliki fungsi luas sebagai permeabilitas vascular yang digunakan sebagai marker atau penanda angiogenesis. Peningkatan angiogenesis akan memperbaiki permeabilitas yang nantinya akan memberikan ekstrasvasi cairan dan nutrisi yang nantinya akan dialirkan pada tubulus seminiferus sehingga membantu dalam spermatogenesis (Ihvaricci, 2014).

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) merupakan reseptor tirosin kinase dari VEGF yang memiliki fungsi bersama-sama dalam proses angiogenesis. VEGFR-1 akan membantu VEGF dalam proses angiogenesis dengan mengikat VEGF-A sehingga mengakibatkan dimerisasi dan aktivasi tirosin kinase untuk proses sinyal transduksi sel (Dai *and* Rabie, 2007). Setiap jaringan membutuhkan vaskularisasi untuk mengalirkan oksigen, hormon, dan nutrisi. Pada organ testis VEGF dan VEGFR-1 dapat terekspresi pada sel leydig dan sel sertoli yang dapat diamati melalui pewarnaan imunohistokimia. VEGF dan VEGFR pada testis membutuhkan remodeling pada vaskularisasi untuk melancarkan aktivitas kerja tubuh dan mencegah apoptosis jaringan pada daerah testis yang merupakan organ reproduksi pada hewan jantan yang mengalami penuaan (Svingen *and* Koopman 2013).

Penurunan vaskularisasi akibat penuaan pada hewan usia tua dibutuhkan fitosterol untuk mempengaruhi aktivitas estrogen reseptor sehingga dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan VEGFR-1. Fitosterol merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Hal ini dapat menyebabkan pada pembentukan spermatozoa jumlahnya menjadi lebih banyak atau meningkat (Samsiar dkk., 2013). Maka penelitian ini mempelajari potensi fitosterol ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pengaruh ekspresi VEGF dan VEGFR-1 pada jaringan testis tikus putih usia tua sebagai upaya untuk perbaikan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut didapatkan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi VEGF pada jaringan interstitial testis tikus putih usia tua?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis tikus putih usia tua?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 2 tahun serta memiliki berat badan 300 gram. Tikus yang digunakan telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang No : 842-KEP-UB (Lampiran 6).
2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB yang diberikan secara peroral selama 21 hari.
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL selama 21 hari yang diberikan secara peroral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuan. Simplisia tanaman

pegagan telah mendapat determinasi tumbuhan dari UPT Materia Medica Batu No. 074/373/102.7/2017 (Lampiran 7).

4. Pembacaan ekspresi VEGF dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya 20x lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung manual dengan melihat sel yang terwarnai coklat.
5. Pembacaan ekspresi VEGFR-1 dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya 20x lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung manual dengan melihat sel yang terwarnai coklat.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi VEGF pada jaringan interstitial testis tikus putih usia tua.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis tikus putih usia tua.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai perbaikan dalam ekstrasvasi pembuluh darah terhadap ekspresi VEGF dan VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis tikus putih usia tua dengan metode Immunohistokimia.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penuaan (Senilitas)

Penuaan adalah suatu proses yang akan dialami oleh semua makhluk hidup. Penuaan adalah penurunan fungsi biologik dari usia kronologik, proses menghilangnya kemampuan jaringan secara perlahan-lahan untuk memperbaiki atau mengganti diri dan mempertahankan struktur, serta fungsi normalnya. Akibatnya tubuh tidak dapat bertahan terhadap kerusakan atau memperbaiki kerusakan tersebut. Penuaan dapat ditandai dengan menurunnya fungsi fisik, fisiologis, massa otot, penurunan energi maupun penurunan sistem tubuh (Kartiko, 2015).

Proses penuaan terjadi pada semua sel di dalam tubuh, termasuk sel yang menyusun sistem organ reproduksi. Proses penuaan sistem organ reproduksi pada makhluk hidup dapat diidentifikasi dari berbagai parameter, salah satunya dari penurunan progresif fungsi sistem reproduksi. Penurunan fungsi reproduksi dapat dilihat dari perubahan histologi testis dan organ aksesorisnya serta perubahan kadar hormon yang diproduksi (Ekputri, 2014).

Terdapat 4 teori penuaan sebagai berikut (Pangkahila, 2013) :

a. *“Wear and Tear” Theory*

Teori ini menyatakan bahwa organ akan mengalami kerusakan apabila dipakai secara berlebihan dan semakin tubuh melakukan aktivitas yang berlebihan akan menimbulkan banyak kerusakan sehingga tubuh tidak mampu memperbaiki.

b. *The Neuroendocrinology Theory*

Teori ini menyatakan tubuh tidak mampu memproduksi hormon untuk mengimbangi fungsinya yang berlebihan sehingga tubuh akan mengalami kekurangan hormon secara menyeluruh sehingga terjadi proses penuaan. Mekanisme umpan balik hipotalamus, hipofase dan organ sasaran masih bekerja namun akibat kerjanya yang berlebihan sehingga poros hipotalamus-hipofase dan organ sasaran tidak dapat menyeimbangi sehingga proses penuaan akan tetap terjadi. Penurunan kemampuan hipotalamus dikaitkan dengan hormon kortisol. Kortisol dihasilkan dari kelenjar adrenal (terletak di ginjal) dan kortisol bertanggung jawab untuk stres. Hal ini dikenal sebagai salah satu dari beberapa hormon yang meningkat dengan usia. Jika kerusakan kortisol hipotalamus, maka seiring waktu hipotalamus akan mengalami kerusakan. Kerusakan ini kemudian dapat menyebabkan ketidakseimbangan hormon sehingga hipotalamus kehilangan kemampuan untuk mengendalikan sistem (Dilman *et al.*, 2006).

c. *The Genetic Control Theory*

Teori kontrol genetik mengatur makhluk hidup sesuai dengan apayang telah diatur di dalam DNA. Setiap organisme mempunyai kode genetik yang unik dan berbeda, yang memungkinkan fungsi fisik dan mental tertentu. Sehingga teori ini menyatakan bahwa proses penuaan merupakan hal yang tidak dapat dihindari dan akan semakin terlihat dengan bertambahnya usia.

d. *The Free Radical Theory*

Radikal bebas diyakini sebagai salah satu unsur yang mempercepat proses penuaan sehingga terbentuknya radikal bebas secara berlebihan harus dihindari untuk menghambat proses penuaan. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan. Radikal bebas memiliki sifat reaktivitas yang tinggi karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal karena hilangnya atau bertambahnya satu elektron pada molekul lain. Radikal bebas akan merusak molekul yang elektronnya ditarik oleh radikal bebas tersebut sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, hingga kematian sel. Molekul utama yang dirusak adalah protein, DNA, dan lemak.

Penuaan pada pria atau pejalan tidak menyebabkan berkurangnya ukuran dan berat testis tetapi sel yang memproduksi dan memberi nutrisi yaitu sel leydig pada sperma akan berkurang. Jumlah dan aktivitas sel leydig yang menurun menyebabkan berkurangnya sperma hingga 50% dan penurunan testoteron. Hal ini menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejalan usia tua (Soejono, 2004).

2.2 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan atau *Centella asiatica* adalah tanaman liar yang banyak tumbuh di sekitar perkebunan, tepi jalan, lading, pematang sawah maupun di lading agak basah. Pegagan memiliki ukuran 0,1 – 0,8 m, berbatang pendek dan percabangan batangnya merayap atau stolon, daun tunggal dalam susunan roset atau spiral, terdiri dari 2-10 daun berwarna hijau bentuknya seperti kipas, buah melengkung

seperti ginjal, dengan pangkal yang melekok ke dalam, tangkai daun mencapai 50 cm panjangnya dengan pangkal berbentuk pelepah agak panjang berukuran 5-15 cm, permukaan dan belakang daun licin kadang berambut **Gambar 2.1** (Winarto dan Surbakti, 2003).

Centella asiatica adalah tanaman herbal yang telah dikenal sejak berabad abad yang lalu. Tanaman ini banyak digunakan untuk pengobatan penyakit seperti *asthma*, *ulcers*, *eczema* dan penyembuhan luka (Brinkhaus *et al.*, 2008). Pegagan merupakan salah satu tanaman obat yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Salah satu senyawa yang terdapat di dalam tanaman pegagan adalah madecocassosida yang bermanfaat dalam memicu produksi kolagen. Kolagen sangat bermanfaat dalam membantu merangsang regenerasi sel kulit. Selain itu, kolagen juga berfungsi meregenerasi sel telur pada betina dan sel sperma pada jantan. Kandungan karoten yang ada di dalam pegagan adalah antioksidan alami, selain itu, manfaat dari karoten juga meningkatkan kualitas sel telur dan sel sperma.



Gambar 2.1 Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Solihati, 2013).

Klasifikasi tanaman pegagan (Winarto dan Surbakti, 2003) :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub-divisi : Angiospermae

Kelas : Dikotyledonae

Ordo : Umbellales

Famili : Umbelliferane

Genus : Centella

Spesies : *Centella asiatica*

Kandungan nutrisi pegagan **Tabel 2.1** (Kormin, 2005) :

Tabel 2.1 Komposisi nutrisi pegagan

% Ekstrak Pegagan	Komposisi nutrisi per 100g sampel						
	Proximate komposisi						
	Kcl Energy	g Air	g Protein	g Lemak	g CHO	g Serat	G Ash
	37	87,7	2	0,2	6,7	1,6	1,8
	Vitamin						
	µg Retional	µg Karoten	µg RE	µg B1	µg B2	µg Niacin	µg C
	0	2649	442	0,09	0,19	0,1	48,5
	Mineral						
	mg Ca	mg P	mg Fe	mg Na	mg K	-	-
	171	32	5,6	21	391		

Pegagan memiliki berbagai bahan aktif meliputi ; a) titerpenoid saponin, b) minyak essensial, c) triterpenoid genin, d) flavonoid, e) fitosterol dan bahan aktif lainnya (Winarto, 2003). Pada penelitian Sukha *et al* (1999), menyimpulkan bahwa paparan pegagan yang mengandung asiatikosida pada CAM (*Chick Chorioallantoic Membrane*) memperlihatkan adanya pembentukan pembuluh

darah baru, karena pegagan memiliki efek merangsang ekspresi faktor pertumbuhan yang terlibat dalam pembentukan pembuluh darah. Aktivitas tingginya antioksidan dikarenakan adanya kandungan asiatikosida dan flavonoid pada *Centella asiatica*.

Pegagan juga memiliki kandungan yang dapat menyuburkan sistem reproduksi karena mengandung fitosterol. Fitosterol merupakan turunan senyawa sterol yang dahulu hanya ditemukan pada hewan dalam bentuk kolesterol sebagai bahan baku pembentuk hormon reproduksi. Menurut penelitian Lusiana dkk., (2013) bahwa selain kandungan triterpenoid, tanaman pegagan juga mengandung fitosterol yang merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Senyawa fitosterol yang terdapat pada tumbuhan antara lain yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Senyawa fitosterol dapat mempengaruhi sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron. Hormon testosteron berfungsi untuk pematangan akhir spermatozoa. Selain mempengaruhi spermatogenesis, testosteron juga mengatur sifat-sifat seksual sekunder, rangsangan seksual, perkembangan saluran-saluran kelamin dan kelenjar kelamin tambahan.

Kandungan fenol dan fitosterol dalam ekstrak etanol kemangi (*Ocimum americanum* L.) dapat meningkatkan kualitas dan konsentrasi sperma. Fitosterol yang terkandung juga dapat bertindak sebagai prekursor steroid untuk mempengaruhi sel leydig memproduksi hormon testosteron, sehingga terjadi peningkatan hormon testosteron. Hormon testosteron memiliki peran penting dalam spermatogenesis di dalam testis serta pematangan sperma dalam epididimis (Hustasuhut, 2014).

Fitosterol merupakan triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin *siklopentana perhidrofenantrena*, kerangka dasar tersebut menyerupai kerangka steroid yaitu kolesterol. Senyawa triterpenoid dapat meningkatkan senyawa steroid dalam darah. Peningkatan kadar steroid dalam darah disebabkan oleh senyawa triterpenoid yang memiliki keserupaan dan kemungkinan adanya kaitan biogenesis dengan steroid dan steroid merupakan bahan baku untuk mensintesis hormon testosteron. Kolesterol dipakai untuk biosintesis hormon steroid yang mencakup hormon reproduksi, diantaranya androgen (testosteron) (Elyal, 2012).

2.3 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan dikembangbiakkan untuk kepentingan laboratorium. Hewan coba dimanfaatkan untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai bidang ilmu dalam skala penelitian. Hewan model adalah objek hewan sebagai tiruan manusia atau spesies lain, yang digunakan untuk menyelidiki fenomena biologis atau patologis. Hewan yang sering digunakan sebagai hewan model adalah tikus, guinea pig dan kelinci (Hau and Hoosier, 2003). Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda disbanding dengan mamalia lainnya. Tikus sering digunakan pada berbagai penelitian karena tikus mempunyai karakteristik mudah berkembangbiak, murah serta mudah untuk mendapatkannya (Maula, 2014).

Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus putih memiliki beberapa galur yang merupakan hasil dari pembiakkan sesama jenis atau persilangan seperti Wistar, Sprague Dawley, Madison, Wicoustin, dan Long Evans. Tikus putih termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Tikus *Rattus novergicus* digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa asam amino, sistem metabolisme dan organnya hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian, perkembangannya cepat dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).

Klasifikasi tikus putih menurut Sirois (2005) adalah sebagai berikut:



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Sub Famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus *Sprague Dawley* yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih berwarna merah, ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang lebih panjang daripada tubuhnya. Berat badan tikus jantan pada umur 12 minggu mencapai 240 g, sedangkan betinanya mencapai 200 g (**Gambar 2.2**). Tikus *Sprague Dawley* pertama kali diproduksi oleh peternakan *Sprague Dawley*. Tikus ini merupakan jenis *outbred* tikus albino serbaguna secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utama menggunakan tikus galur SD (*Sprague Dawley*) adalah ketenangan, kemudahan penanganannya dan merupakan galur tikus yang paling besar diantara galur yang lain (Maula, 2014). Menurut Wilkinson *et al* (2000) penelitian tentang reproduksi pada umumnya menggunakan tikus-tikus strain *Sprague Dawley* dan wistar yang merupakan turunan hubungan jauh (*outbred*) yang memiliki fertilitas yang tinggi dan sifat-sifat perkawinan yang konsisten, namun tikus *Sprague Dawley* lebih diunggulkan jika dilihat pada parameter besarnya testis, jumlah sperma pada testis dan epididimis, berat kelenjar aksesorius, dan sirkulasi darah pada testostosterone.



Gambar 2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley (Akbar, 2010).

Adapun data biologis tikus sebagai berikut **Tabel 2.2** (Kusumawati, 2004).:

Tabel 2.2 Data biologis tikus

Lama hidup	2-3 tahun, hingga 4 tahun
Lama produksi ekonomis	1 tahun
Temperatur tubuh	37,5°C
Umur dewasa	50-60 hari
Kebutuhan makanan	5 gr/100 gr BB
Kebutuhan air	8-11 mL/100 gr BB
Tekanan darah	
Sistolik	84-174 mmHg
Diastolik	58-145 mmHg
Frekuensi jantung	330-480 / menit
Frekuensi respirasi	66-114 / menit

2.4 VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

Vaskulogenesis adalah perkembangan pembuluh darah pada awal perkembangan embrio. Angiogenesis adalah pembentukan, *remodeling*, dan ekspansi pembuluh darah menjadi arteri, vena, dan kapiler pada saat *postnatal*. VEGF adalah protein homodimer 40kD, yang termasuk keluarga glikoprotein, yang berperan dalam vaskulogenesis dan angiogenesis (Jussila *and* Alitalo, 2002).

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) merupakan suatu glikoprotein homodimerik di dalam tubuh yang dapat mempengaruhi angiogenesis dan vasopermeabilitas. Kemampuannya yang dapat meningkatkan permeabilitas mikrovaskular, sehingga awalnya disebut sebagai faktor permeabilitas. VEGF merupakan mitogenik khusus untuk sel endotel vascular. Kadar VEGF dalam tubuh dapat dideteksi pada plasma dan serum. Kadar VEGF dalam tubuh individu sehat berkisar antara 0-115 pg/mL pada plasma dan 62-707 pg/mL pada serum (Hoeben *et al.*, 2014).

Faktor pertumbuhan VEGF memiliki struktur yang mirip dengan *platelet derived growth factor* (PDGF) (Samiasih, 2010). Keluarga gen VEGF yang telah ditemukan antara lain seperti VEGF A, B,C,D dan E, tetapi VEGF A yang banyak berperan. VEGF A bekerja melalui ikatan reseptor VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor 1*) dan VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor 2*) untuk menginduksi diferensiasi, proliferasi dan migrasi sel endotel (Abdullah dkk, 2009). Faktor pertumbuhan VEGF memiliki kemampuan untuk memicu pertumbuhan sel endotel vascular yang berasal dari arteri, vena, dan pembuluh limfe serta menginduksi ekspresi protein anti apoptosis seperti Bcl-2 pada endotel (Saerang, 2013). Gen VEGF berlokasi pada kromosom 6p213 dan ekspresinya diatur oleh faktor pertumbuhan seperti reseptor seluler (HER-2), onkogen dan gen supresor tumor, estrogen, hipoksia, dan sitokin (Abdullah dkk, 2009).

Kerja VEGF yaitu merangsang protease endothel, merangsang proliferasi dan migrasi endotel, dan meningkatkan terbentuknya jaringan mikrovaskuler. VEGF juga dapat meningkatkan ketahanan endotel serta menghambat aktivitas apoptosis (Basyar dan Sanif, 2014). Menurut Svingen *and* Koopman (2013) semua organ membutuhkan vaskularisasi untuk mengantarkan oksigen, nutrisi, hormon, dan membuang hasil akhir metabolisme. Vaskularisasi pada testis dibutuhkan untuk suplai darah yang berguna untuk mengatur suhu saat waktu subur. Peran dan regulasi dari VEGF dan reseptornya di testis, terutama dalam reproduksi belum dipelajari. Namun VEGF dapat memainkan peran penting terhadap fisiologi dan

patologi yang terlibat dalam pertumbuhan testis dan regresi pada perkawinan hewan (Rudolfsson *et al.*, 2004).

VEGF yang merupakan faktor permeabilitas vaskular (VPF) dan reseptornya dapat ditemukan pada testis. Pada pengamatan imunohistokimia VEGF dalam testis dapat diamati pada sel leydig dan sel sertoli. Dalam penelitian Papparella *et al.*, (2013) mengatakan bahwa VEGF memiliki peran sebagai mitogenik dan angiogenik dengan pengaruh permeabilitas dalam kapiler darah. Fungsi VEGF dalam saluran reproduksi jantan masih banyak diperdebatkan, namun fungsinya pada semen dapat menunjukkan tingkat kesuburan. Produksi VEGF yang berlebihan dapat menekan spermatogenesis dengan menghambat proliferasi spermatogoni dan menghasilkan aspermatogenesis dan infertilitas. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa VEGF dapat menyebabkan fosforilasi endotelial sintesis nitrit oksida dan menghasilkan pelepasan nitrit oksida phosphatidylinositol3;-kinase-AKT pada sel vascular endotel (Shiraishi, 2008).

2.5 VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*)

Aktivasi sinyal VEGF dipengaruhi oleh membran spesifik pada reseptornya. Ikatan VEGF dengan reseptornya menginduksi homodimerisasi dan heterodimerisasi reseptor yang akan mengaktifasi aktivitas reseptor kinase, reseptor autofosforilasi dan *downstream signaling*. Sebagai ligan maka VEGF akan bekerja bila berikatan dengan reseptornya, yaitu *receptor tyrosine kinases* (RTKs) serta ikatan dengan *co-receptor* baik *heparin sulphate proteoglycans* (HSPGs) dan *neuropilins* (NP) (Olsson *et al.*, 2006).

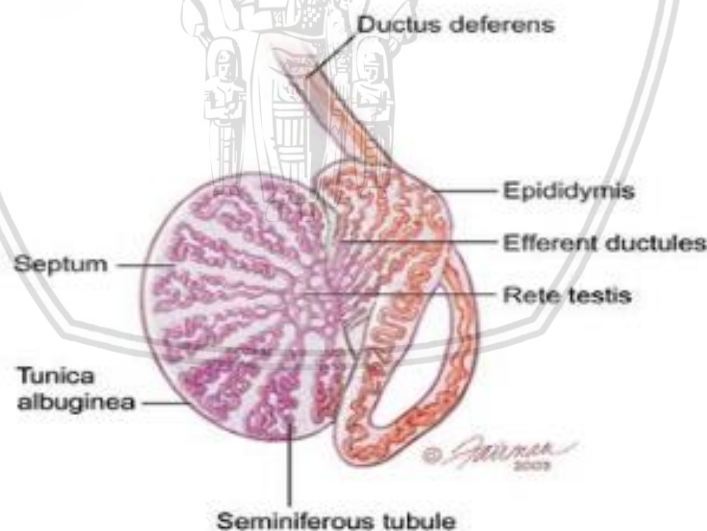
Reseptor VEGF terdiri dari reseptor tirosin kinase dan non tirosin kinase. Reseptor tirosin kinase terdiri dari VEGFR-1 / Flt-1, VEGFR-2 / Flk-1, dan VEGFR-3 / Flt-4. Reseptor non tirosin kinase atau *co-receptor* terdiri dari neuropilin-1 (Nrp-1) dan neuropilin-2 (Nrp-2). Ikatan VEGF dengan VEGFR mengakibatkan dimerisasi dan aktivasi tirosin kinase. Aktivasi ini memulai proses transduksi sinyal sel (Dai and Rabie, 2007).

VEGR-1 atau *fms-like tyrosine kinase receptor-1* (Flt-1) adalah protein transmembran 180kDa, yang terdapat di endotel vaskuler, dimana berperan dalam sinyal transduksi selama vaskulogenesis dan angiogenesis. VEGFR-1 berikatan dengan VEGF-A, VEGF-B, dan PlGF (Dai and Rabie, 2007). VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*) adalah keluarga dari VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) yang mengikat VEGF-A, VEGF-B, PlGF. VEGFR-1 memainkan peran negatif dalam angiogenesis pada embriogenesis. VEGFR-1 tidak hanya diekspresikan pada sel endotel tapi juga pada makrofag, dan mempromosikan fungsi makrofag, penyakit inflamasi, metastasis kanker dan aterosklerosis melalui aktivitas kinase (Shibuya, 2006).

VEGF dan reseptornya VEGFR-1 (Flt-1) sangat penting dalam regulasi dan memainkan peran penting dalam fisiologi vaskularisasi dan angiogenesis. Pada testis yang normal ditemukan VEGF pada sel sertoli dan sel leydig, namun tidak dalam pembuluh darah. VEGFR-1 banyak ditemukan pada sel sertoli, sel leydig, sel perivaskular dan juga sel endotel. Reseptor VEGF berbeda pada setiap sel, VEGFR-1 dijumpai pada saat spermatid (Davidoff et al., 2009).

2.6 Testis

Organ utama dari sistem reproduksi jantan adalah testis (**Gambar 2.3**). Berada dalam kantung skrotum. Testis bertanggungjawab atas steroidogenesis dan spermatogenesis dalam pertumbuhan sel-sel germinal haploid. Fungsi tersebut terjadi pada sel-sel leydig dan tempat pembentukan sperma tubulus seminiferus. Pada bagian luar berbentuk convex dan licin. Testis dilindungi oleh *tunica vaginalis propina* yang di dalamnya terdapat *ductus epididimis* dan *ductus deferens*. Di dalam tubulus mengandung sel leydig berfungsi menghasilkan hormon testosteron. Tubulus seminiferus contorti menuju ke tubulus seminiferus rectus yang akan membentuk rete testis dan akan menyalurkan spermatozoa ke *ductus epididimis* (Fox, 2002).



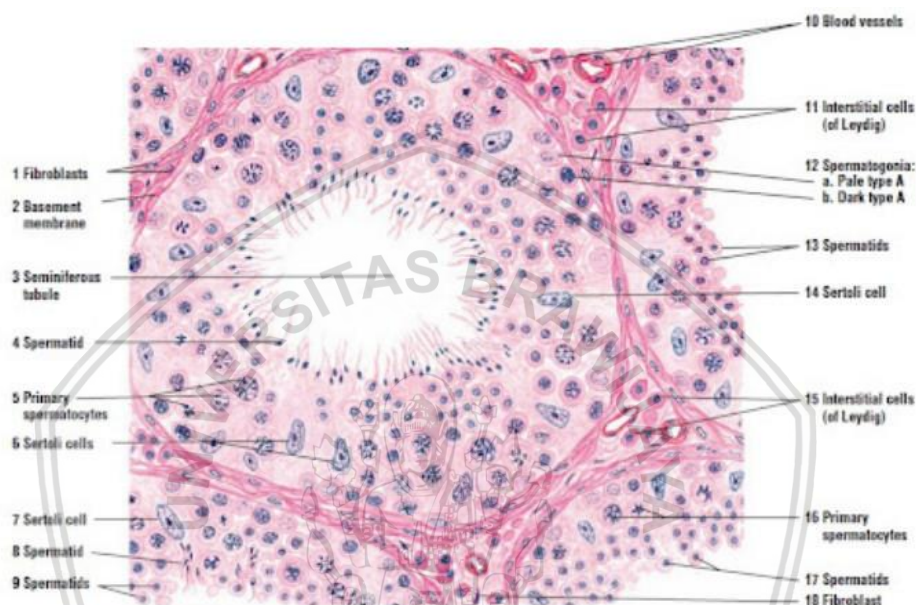
Gambar 2.3 Anatomi testis (Faranita, 2009).

Diantara tubulus seminiferus di dalam testis terdapat sel leydig yang merupakan sel interstitial berfungsi untuk mensekresikan hormon testosteron ke dalam pembuluh darah. Selain sel germinal, di dalam tubulus seminiferus juga terdapat sel sertoli. Sel ini berperan secara metabolik dan struktural untuk menjaga spermatozoa yang sedang berkembang juga memfagosit sitoplasma spermatid yang telah dikeluarkan. Sel sertoli mensekresikan *Androgen Binding Protein* (ABP), inhibin, dan *Mullerin Inhibiting Substance* (MIS). Sel sertoli mengandung aromatase, enzim yang berperan dalam perubahan androgen menjadi estrogen (Faranita, 2009).

Sel sertoli dalam tubulus seminiferus mampu mempertahankan ketersediaan nutrisi selama berlangsungnya spermatogenesis. Sel sertoli yang berfungsi sebagai *Blood tester barrier*, penghasil hormon inhibin dan aromatisasi hormon testosteron menjadi estradiol 17β (estrogen). Dasar sel sertoli menempel pada membran basalis dan menjulur menuju lumen tubulus seminiferus. Sel sertoli memanjang dengan inti sel berbentuk oval, di dalamnya berisi satu atau banyak nukleolus, satu bagian bersifat eosinofilik dan atau bagian lainnya bersifat basofilik (**Gambar 2.4**) (Susilawati, 2011).

Sel leydig memiliki nukleus yang berbentuk bulat, ukuran besar dan sitoplasma eosinofilik serta memiliki satu atau lebih nukleolus yang berisi granula kasar. Jumlah sel leydig sebelum dan sesudah pubertas bertambah akibat dua mitosis. Perkembangan sel leydig yaitu : 1) diawali proliferasi sel precursor, 2) diferensiasi sel precursor menjadi sel progenitor, 3) diferensiasi sel progrenitor menjadi sel leydig baru, 4) berkembang menjadi sel leydig muda, 5) menjadi sel

leydig dewasa. Sel leydig berfungsi menghasilkan hormon testosteron yang selain berfungsi untuk proses spermatogenesis juga berfungsi untuk pematangan spermatozoa dalam epididimis dan meningkatkan libido untuk mengkawini betina (Susilawati, 2011).

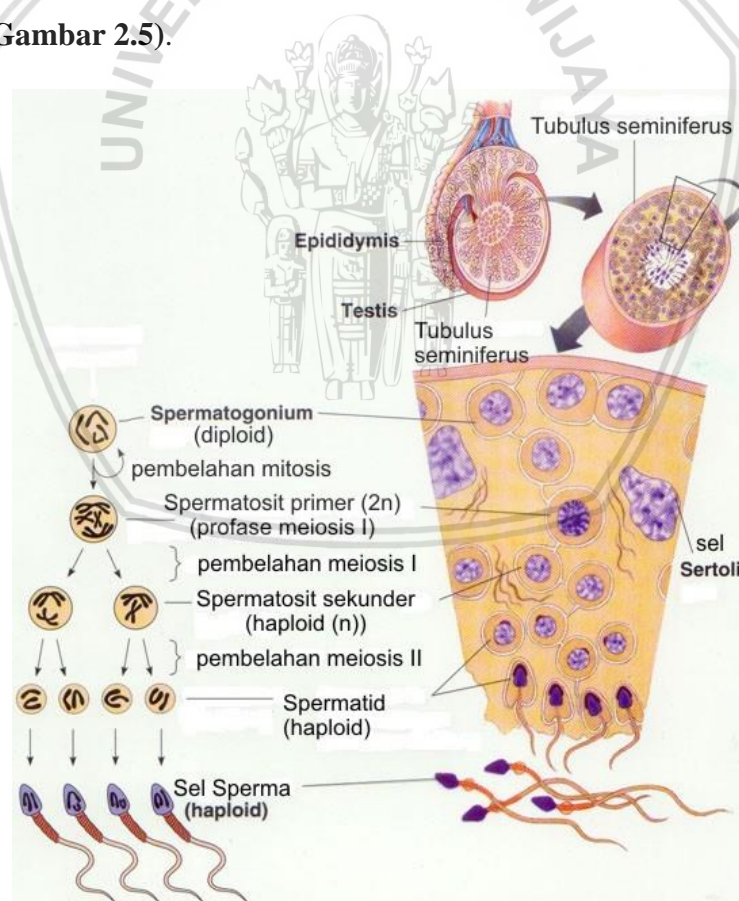


Gambar 2.4 Penampang histologi Sel Leydig dan Sel Sertoli (Hill, 2011).

2.6.1 Spermatogenesis

Spermatozoa atau sering juga disebut dengan *sperm cell* merupakan sel haploid (n) yang dibentuk di dalam tubulus seminiferus dari gamet jantan melalui proses kompleks yang disebut spermatogenesis. Spermatozoa merupakan hasil perkembangan dari sel germinal yang berada di testis, dikeluarkan dari tubuh organisme jantan dalam bentuk semen (spermatozoa dan plasma semen). Spermatogenesis adalah proses pembelahan dan perkembangan spermatogonia (*germ cell*) membentuk spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testis. Sel germinal merupakan sel induk dari sel spermatogenik. Keberadaan sel germinal diatur secara regular yang

terletak di bagian dasar tubulus seminiferus (spermatogonia) yang akan berkembang menjadi spermatosit, semua terletak di lapisan epitel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis dibagi menjadi dua tahap, yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis adalah perubahan spermatogonia menjadi spermatid. Spermatogonia merupakan sel bakal spermatozoa, terletak pada membran basal epitel tubulus seminiferus, dengan ciri-ciri vesikular dengan membran inti yang jelas. Spermatogonia memperbanyak diri (proliferasi) secara kontinyu melalui proses mitosis, menghasilkan spermatogonia dalam jumlah besar (**Gambar 2.5**).



Gambar 2.5 Proses Pembentukan Sperma (Campbell *et al.*, 2006).

Spermatogonia berhenti berproliferasi, kemudian mengalami differensiasi dengan membelah secara mitosis menjadi spermatosit primer. Setiap spermatosit primer bergerak ke dalam dari epitel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Sel ini mengandung kromosom diploid berkembang menjadi sel yang berukuran paling besar dari seluruh sel spermatogenik. Selanjutnya, terjadi duplikasi DNA dan mengalami pembelahan meiosis I sehingga menghasilkan spermatosit sekunder. Pada pembelahan ini menghasilkan variasi genetik, seperti pemisahan secara random kromosom induk dan *cross over* kromosom, meningkatnya variasi genetik gamet. Kemudian spermatosit sekunder membelah lagi melalui proses meiosis II untuk menghasilkan empat sel spermatid yang mengandung kromosom haploid (Hayati, 2010).

2.6.2 Peran Hormon pada Spermatogenesis

Proses pembentukan sperma dipengaruhi oleh hormon-hormon yang dihasilkan oleh organ hipotalamus, hipofisis dan testis sendiri. Testis memproduksi hormon jantan yang disebut androgen, yang paling poten dari androgen adalah testosteron. Fungsi dari hormon testosteron adalah merangsang pendewasaan spermatozoa yang terbentuk di dalam tubulus seminiferus, merangsang pertumbuhan kelenjar-kelenjar aksesori, dan merangsang sifat jantan (Hutasuhut, 2014).

Spermatogenesis dan pematangan sperma sewaktu bergerak di sepanjang epididimis dan vas deferens memerlukan hormon androgen. Hormone androgen juga mengontrol pertumbuhan dan fungsi vesikula

seminalis serta kelenjar prostat. Spermatogenesis hampir seluruhnya terjadi di bawah pengaruh hormon-hormon yang berasal dari hipofisa, terutama FSH. Spermiogenesis adalah lanjutan spermatogenesis yang berlangsung di bawah peranan LH dan hormon testosteron. Tanpa hormon testosteron, spermatozoa tidak dapat mencapai pendewasaan yang baik.

Aksi FSH pada spermatogenesis diduga diperantarai oleh sel sertoli, karena hormon peptida tidak dapat secara langsung mencapai spermatosit dan spermatid karena barrier darah testis yang terbentuk selama 16-19 hari setelah dilahirkan. Adanya reseptor androgen pada sel germinal masih kontroversial, sementara ini reseptor tersebut telah ditemukan dalam sel leydig, sel peritubular, sel sertoli dan lapisan otot pembuluh darah pada sebagian arteri dalam testis tikus. Hal ini menunjukkan bahwa peran testosteron pada spermatogenesis ialah pada mediasi terakhir. Salah satu peran sel sertoli adalah memproduksi protein-pegikat androgen, yang dirangsang oleh FSH dan hormon testosteron (Krinke, 2000).

Kadar hormon tersebut selalu pada *critical range* yang dikontrol oleh *feed back* mekanisme. *Feed back* mekanisme dalam mengatur hubungan tersebut terbagi menjadi: 1) *Long Feed Back Loop* yang merupakan hubungan timbal balik antara steroid gonad, sekresi gonadotropin dan sekresi GnRH, 2) *Short Feed Back Loop* yang merupakan hubungan negatif gonadotropin terhadap sekresi gonadotropin hipofise melalui hambatan pada GnRH Hypothalamus (Tjipto, 2010).

Testosteron merupakan hormon golongan steroid yang berikatan dengan reseptor intrasel yang disebut sebagai Androgen Receptor (AR) dan menyebabkan perubahan pada reseptor berupa gabungan hormon reseptor, kemudian gabungan ini berkaitan dengan daerah spesifik pada kromatin sel, yang kemudian menghasilkan sejumlah aktivitas pada sel tersebut berupa transkripsi, translasi dan replikasi. Pada penurunan kadar hormon androgen dari kadar normal sampai nol, terjadi peningkatan dari AR mRNA pada sejumlah jaringan, namun demikian jumlah AR tidak meningkat secara bermakna dikarenakan waktu paruh dari AR tersebut menurun seiring dengan penurunan konsentrasi kadar androgen. Peningkatan kadar hormon androgen dari normal hingga kadar suprafisiologis menunjukkan jumlah AR yang meningkat pada sejumlah jaringan, peningkatan ini diduga karena peningkatan waktu paruh dari AR sebagai akibat peningkatan kadar hormon androgen (Tjipto, 2010).

1.6.3 Gangguan Reproduksi Hewan Usia Tua

Penuaan adalah perubahan secara ireversibel dari waktu ke waktu pada semua organisme eukariotik, sel molekul, jaringan, organ, dan sistem reproduksi juga mengalami penurunan kapasitas. Dalam penuaan juga terdapat perubahan struktural dan fungsi dalam sistem reproduksi jantan, antara lain (Gunes *et al.*, 2016) :

1. Efek penuaan pada organ seksual

Pada saat kondisi tua, terjadi perubahan volume pada testis yang diakibatkan serum gonadotropin yang mengakibatkan penurunan pada

hormon testosteron. Penurunan jumlah sel leydig yang bekerja pada umpan balik dan menyebabkan peningkatan sekresi gonadotropin. Peningkatan gonadotropin yang terkait usia terutama disebabkan oleh kegagalan testis primer. Pada proses penuaan terjadi penurunan sel sertoli, sel germinal, lipatan epitel pada tunika propia tubulus seminiferus menurun, vaskularisasi testis berkurang, sehingga terjadi penyempitan pada tubulus seminiferus.

2. Efek penuaan pada parameter semen

Parameter semen berubah dengan seiring bertambahnya usia, mulai dari produksi sperma setiap hari, jumlah sperma total, dan viabilitas sperma secara negative berkorelasi dengan usia. Produksi sperma setiap hari menurun lebih dari 30% pada pria berusia di atas 50 tahun. Parameter semen yang diukur yaitu volume air mani, konsentrasi sperma, motilitas sperma dan morfologi sperma, dan satu parameter turunan yaitu jumlah total sperma.

3. Efek penuaan pada sistem endokrin

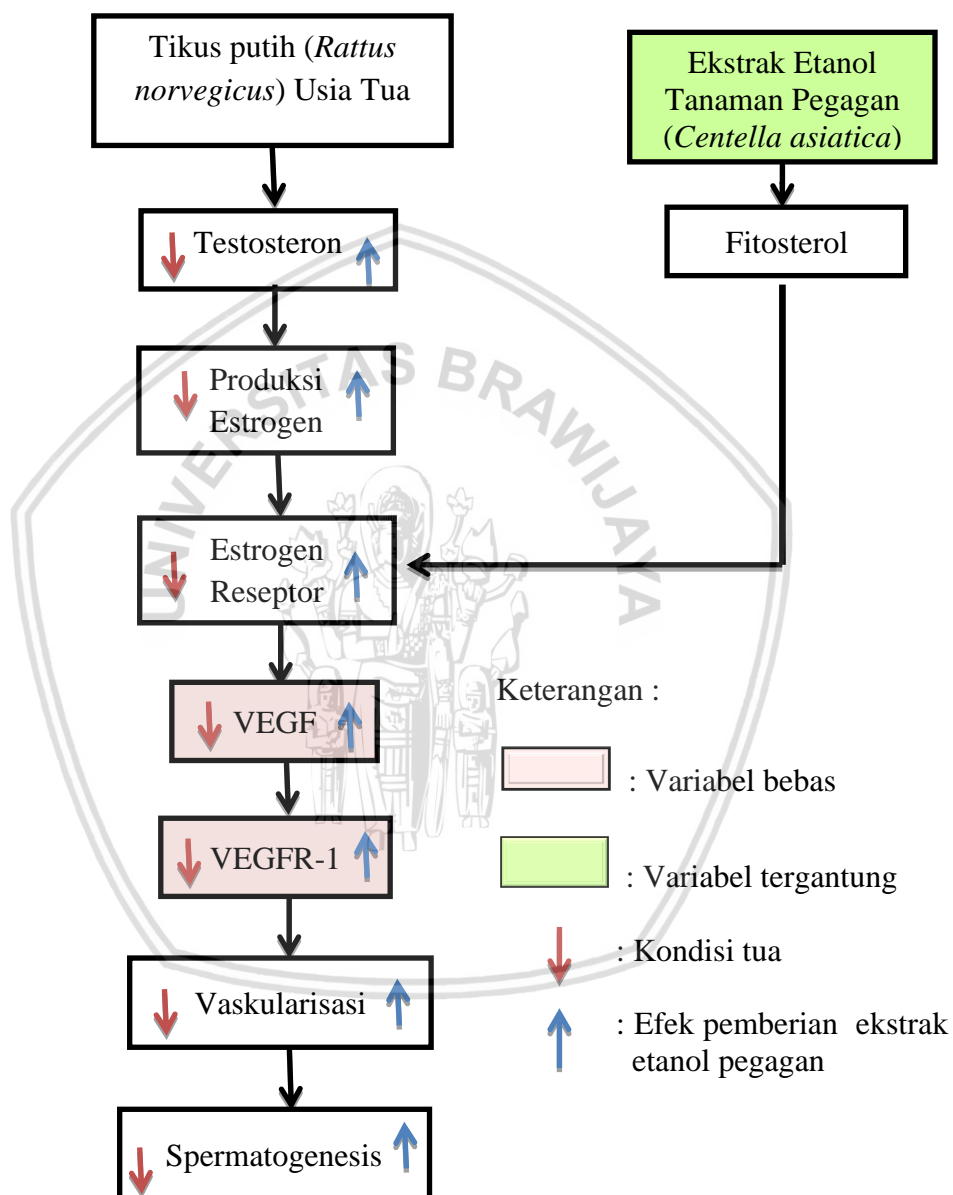
Hypothalamic pituitary gonadal pada jantan memiliki fungsi mengendalikan pelepasan hormon seksual dan untuk memastikan pembentukan dan pematangan sel spermatogenik. HPG ini disusun oleh hipotalamus, hipofisis anterior, dan testis. GnRH yang dikeluarkan dari hipotalamus mencapai kelenjar pituitari anterior melalui sistem portal hipofisa dan merangsang sekresi hormone LH (*Luteinizing Hormone*) dan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) ke dalam pembuluh darah oleh sel

gonadotropik. LH menginduksi produksi hormon testosteron oleh sel leydig, sedangkan sel sertoli untuk mensekresikan ABP (*Androgen Binding Protein*) dan menghambat perkembangan spermatogenesis. Tingkat hormon testosteron menurun seiring bertambahnya usia akibat penurunan jumlah sel leydig, kemunduran perfusi testis, dan gangguan pada sekresi gonadotropin korionik.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Penuaan adalah suatu keadaan fisiologis tubuh yang akan dialami semua makhluk hidup. Penggunaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan usia tua yaitu 2 tahun karena masa aktif produksi tikus hingga umur 1 tahun sehingga mengalami penurunan hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen. Penurunan hormon testosteron akan menurunkan produksi hormon estrogen, karena hormon testosteron akan dirubah menjadi estrogen melalui proses aromatisasi oleh enzim aromatase di sel sertoli yang merupakan hasil steroidogenesis. Hormon estrogen memiliki peran penting dalam perkembangan dan menjaga fungsi reproduksi serta fertilitas pria. Hormon estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor. Reseptor dari Estrogen yaitu estrogen α dan β (ER- α dan ER- β), sehingga penurunan hormon estrogen mengakibatkan penurunan ekspresi estrogen reseptor α dan β . Reseptor estrogen α dan β merupakan faktor mediasi dari estrogen untuk mengaktivasi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dan reseptornya VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*) yang berakibat terjadinya kegagalan pembentukan pembuluh darah baru.

VEGF pada sel endothelial sel leydig dan sel sertoli mempunyai fungsi biologis untuk mengikat VEGFR-1. VEGF dan VEGFR-1 merupakan faktor permeabilitas yang dapat mengantarkan oksigen, hormon, dan nutrisi pada jaringan, namun pada saat kondisi tua vaskularisasi akan menurun sehingga akan menghambat asupan hormon dan untuk menutrisi sel sertoli pada proses pembentukan spermatozoa. Sel leydig terdapat diantara tubulus seminiferus yang berfungsi memproduksi hormon testosteron. Penurunan jumlah dan aktivitas sel

leydig dapat menyebabkan sperma berkurang hingga 50% dan hormon testosteron juga mengalami penurunan. Menurut Caireset *al* (2009), VEGF dalam testis mempunyai peranan mempertahankan kelangsungan hidup sel-sel germinal pada proses pembentukan spermatozoa, dan menjaga kesuburan.

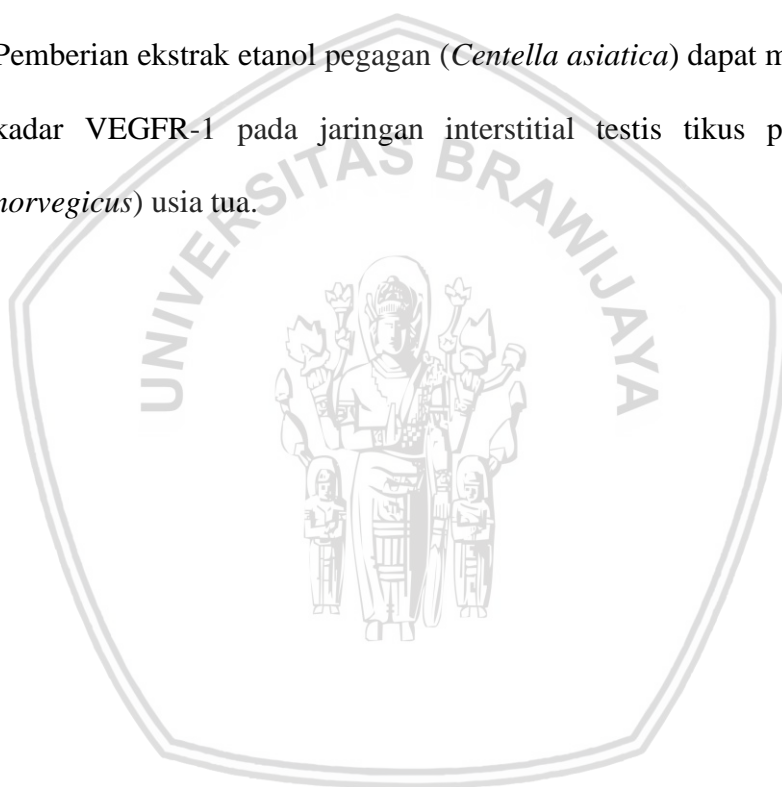
Produksi VEGF oleh sel endothel diperlukan untuk membentuk pembuluh darah baru. Namun ketika ekspresi VEGF dan VEGFR-1 menurun maka akan berakibat pada hambatan transfer hormon testosteron untuk sel sertoli member nutrisi pada sel-sel germinal melalui komplek junction. VEGF merupakan faktor potensial angiogenesis yang pertama digambarkan pada faktor pertumbuhan yang esensial untuk sel endotel vaskuler. VEGFR-1 merupakan sinyal kunci untuk angiogenesis yang terdeteksi ekspresinya di semua sel endotel dan mengikat kerja dari VEGF.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman liar di sekitar perkebunan dan sawah yang terbukti memiliki kandungan fitosterol yang merupakan sterol pada tumbuhan, sedangkan pada hewan disebut estrogen. Senyawa fitosterol merupakan prekursor steroid dan mempengaruhi sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron. Fitosterol merupakan kandungan tanaman pegagan yang memiliki fungsi profertilitas sehingga dapat meningkatkan jumlah sel-sel spermatogonia selama proses spermatogenesis dan produksi hormon testosteron oleh sel leydig. Hormon testosteron berfungsi untuk pematangan akhir spermatozoa. Sehingga pemberian fitosterol tanaman pegagan dapat mempengaruhi aktivasi estrogen yang dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan VEGFR-1.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar VEGF pada jaringan interstitial testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2017 hingga bulan Oktober 2017.

Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

- a. Proses ekstraksi tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dilakukan di Materia Medica, Batu.
- b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- c. Pengoleksian sampel dan pewarnaan immunohistokimia dan pembacaan ekspresi VEGF dan VEGFR-1 dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- d. Pembuatan preparat histologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, sonde lambung, cawan petri, gelas objek, *cover glass*, tabung reaksi, refrigerator, sentrifugator, pipet tetes, gelas ukur, maserator, vacuum drying, mikrotom, centellan, rotary evaporator, seperangkat alat bedah, pot sampel, mikroskop cahaya.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain 20 ekor tikus putih jantan strain *Sprague Dawley* seberat 300 gram usia 2 tahun, tanaman pegagan (*Centella asiatica*), alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, NaCl fisiologis, aquades, serbu simplisia, etanol 70%, letichin, ekstrak pegagan, aqua bebas CO₂, PFA 4%, alkohol, xylol, PBS, antibodi primer VEGF dan VEGFR-1, *peroxidase*, DAB (*Diaminobenzidine*), Mayer's Hematoxylin.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental *post test control design only* menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K) tikus usia tua, kelompok perlakuan 1 (P1) tikus tua dengan dosis 100mg/kg BB, kelompok perlakuan 2 (P2) tikus tua dengan dosis 200mg/kg BB, dan kelompok perlakuan 3 (P3) tikus tua dengan dosis 300mg/kg BB pada **Tabel 4.1** :

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

2 Kelompok Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
(K) = tikus usia tua yang hanya diberikan pakan dan minum					
(P1) = tikus usia tua diberi ekstrakpegagan dengan dosis 100mg/kg BB					
(P2) = tikus usia tua diberi ekstrak pegagan dengan dosis dosis 200 mg/kg BB					
(P3) = tikus usia tua diberi ekstrak pegagan dengan dosis dosis 300 mg/kg BB					

4.3.2 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Sprague Dawley* usia 2 tahun dengan BB awal 300 g yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (Kusriningrum, 2008) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 5 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk empat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima kali dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 20 ekor hewan coba. Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan dan minum *ad libitum*.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Dosis Ekstrak *Centella asiatica*

Variabel tergantung : Ekspresi VEGF dan VEGFR-1 interstitial sel jaringan testis tikus

Variabel kontrol : Jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, minum dan kondisi kandang tikus putih.

4.3.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cantella asiatica*)

Phytosome ekstrak tanaman pegagan pada penelitian ini dibuat dengan cara membentuk ekstrak terlebih dahulu. Serbuk simplisia sebanyak 400 mg ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 mL untuk 100 mg, dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C (Adianingsih *et al.*, 2013; Pramono dan Ajiastuti, 2004).

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk phytosome dengan metode sonikasi (mencampur letichin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu disriter \pm 3 jam dengan *magnetig striter* 2000rpm. Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO₂ (Acharya, 2011; Adianingsih *et al.*, 2013).

4.3.5 Pemberian Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cantella asiatica*)

Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan menggunakan dosis bertingkat sesuai (Gohil *et al.*, 2010), yaitu 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB sesuai masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 21 hari.

4.3.6 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada akhir penelitian dilakukan *euthanasia* dengan cara dislokasio leher kemudian tikus diletakkan dengan posisi rebah

dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuka muskulus sepanjang abdomen sampai bawah dagu kemudian testis diambil dari scrotum di daerah prepubis dilanjutkan dengan memotong testis kemudian diisolasi. Organ testis lalu dibilas dengan NaCl fisiologis pada cawan petri dan direndam. Kemudian organ testis dimasukkan dalam larutan formaldehide (PFA) 4% (Irawan dkk., 2012).

4.3.7 Analisis Ekspresi VEGF dan VEGFR-1 pada Jaringan Testis dengan Metode Immunohistokimia

Setelah hewan dinekropsi kemudian organ testis diambil lalu dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, dimasukkan dalam larutan formaldehide (PFA) selama 24 jam. Setelah testis terfiksasi, larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai “*stopping point*” dengan pengertian jaringan dapat disimpan lama pada larutan ini. Proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan xylol (*clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin (*embedding*). Jaringan dalam blok parafin disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 5µm dilekatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan alkohol 70% atau 0,2% *Neofren* dalam *toluene*, kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam. Sediaan kemudian diwarnai secara IHK (imunohostokimia) (Samson and Unility, 2014).

Menurut Samson and Unitily (2014), pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang harus dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pembuatan *neufren* (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan *neufren* (agen penempelan), penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan memilih preparat irisan yang paling bagus, kemudian dilakukan perlakuan sesuai prosedur berikut ini :

1. Deparafinasi (xylol III, II, I). Merupakan suatu proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Caranya yaitu preparat dimasukkan ke dalam xylol bertingkat I sampai III masing-masing selama lima menit.
2. Rehidrasi (alkohol absolute III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit.
3. Penghilangan peroksidase endogen (jika terlambat hasilnya positif semua) dengan menggunakan substrat metanol (dicampur sesaat sebelum gelas obyek dimasukkan) dengan cara dicelup dan dibiarkan selama 15 menit.
4. Dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 μ L selama 5-10 menit (2x) dilanjutkan pencucian dengan

menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 μ L selama 5-10 menit (2x).

5. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering, kemudian dibuat lingkaran pembatas di sekitar jaringan dengan menggunakan *hydrophobic marker*. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS (agar memblok antigen/Ag non spesifik dan tidak mengacaukan reaksi), kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit.
6. Dicuci dengan PBS (100 μ L) selama 5 menit (3x).
7. Diberi antibodi/Ab primer VEGF dan VEGFR-1 diinkubasi dalam refigator suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi.
8. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 μ L) selama 10 menit (3x).
9. Diberi antibodi/Ab sekunder yaitu universal antibodi sekunder sebanyak 35-40 μ L per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit (tahap ini berlangsung dalam suasana gelap, tidak boleh ada cahaya).
10. Dicuci dengan PBS (100 μ L) selama 5 menit (3x).
11. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-*diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H₂O₂ (50 μ L). Proses pencampuran ini dilakukan sesaat

sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat.

12. Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit.
13. Counterstain dengan *Hematoxylin*-DW/MQ (optional).
14. Dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Selanjutnya sediaan histologis siap diamati di bawah mikroskop, direkam dengan menggunakan foto digital sebanyak 20x lapang pandang menggunakan perbesaran 1000x dan dihitung manual.

4.3.8 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi VEGF dan ekspresi VEGFR-1 yang diamati menggunakan mikroskop cahaya. Data ekspresi VEGF dan ekspresi VEGFR-1 dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* pada *software SPSS* dan dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ $\alpha = 0,05$.

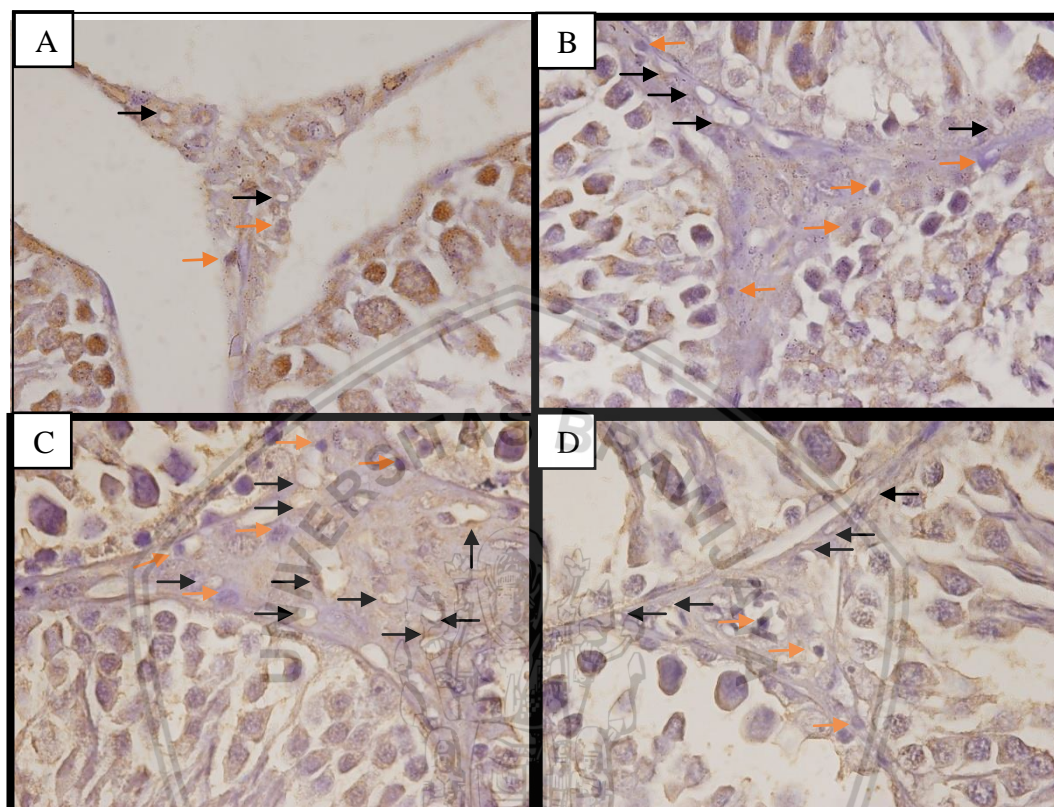
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi VEGF Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan terhadap ekspresi VEGF pada jaringan testis tikus putih usia tua dapat diamati menggunakan metode imunohistokimia. Hasil gambaran imunohistokimia dari ekspresi VEGF ditandai dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 dengan 20 kali lapang pandang pada area interstitial testis.

Ekspresi VEGF pada jaringan testis hewan coba kontrol positif mengalami penurunan pada keadaan tua, ditandai dengan sedikitnya area yang terwarnai coklat **Gambar 5.1.A.** Penurunan ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) disebabkan terjadinya penurunan produksi hormon estrogen karena ERE (Estrogen Reseptor Elemen) merupakan salah satu faktor transkripsi pembentuk mRNA VEGF (Jehnara dkk., 2014). Pada **Gambar 5.1.B** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 100 mg/kg BB, **Gambar 5.1.C** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 200 mg/kg BB, **Gambar 5.1.D** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB intensitas penyebaran warna coklat pada ekstraseluler di daerah interstitial sel tampak lebih banyak terekspresi dibandingkan **Gambar 5.1.A** kontrol positif. Hal tersebut dikarenakan terjadi peningkatan produksi hormon testosteron sehingga dapat menginduksi VEGF

yang merupakan agen penting dalam vaskularisasi pada jaringan testis yang sebelumnya telah diberi ekstrak etanol tanaman pegagan.



Gambar 5.1 Hasil Imunohistokimia VEGF Jaringan Interstitial Testis (Dokumentasi Pribadi).

A = Kontrol Positif (tikus tua),

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100 mg/kgBB),

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200 mg/kgBB),

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300 mg/kgBB),

Keterangan : → Ekspresi VEGF

→ Sel Leydig

Hasil akumulasi ekspresi VEGF dianalisis secara statistika menggunakan ANOVA dan menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) diantara perlakuan. Kelompok kontrol tikus tua yang tidak diberi perlakuan memiliki rata-rata ekspresi VEGF lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Ekstrak etanol tanaman

pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF pada tikus tua yang ditunjukkan dengan perbedaan secara signifikan ($P < 0,05$) (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Ekspresi VEGF pada Jaringan Interstitial Testis Tikus Tua Pasca Terapi dengan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi VEGF \pm SD (sel)
Kontrol	7.8 ± 1.3^a
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	25.0 ± 2.0^b
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	59.8 ± 2.3^d
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	34.2 ± 0.8^c

Keterangan : Notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan.

Dari hasil penelitian, dapat diketahui rata-rata ekspresi VEGF tertinggi pada perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB yakni sebesar (59.8 ± 2.3 sel). Dosis pada kelompok perlakuan 2 merupakan dosis optimum untuk terapi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Pada kelompok perlakuan 1 dosis 100 mg/kg BB kurang optimum karena ekspresi VEGF masih terekspresi sedikit dan menyerupai perlakuan kontrol. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB terjadi penurunan ekspresi VEGF karena dosis yang tinggi dapat menjadikan ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) bersifat anti androgenik sehingga dapat menghambat proses sintesis hormon testosteron.

Pada **Tabel 5.1** uji *One Way* ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan dan ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF melalui produksi estrogen (**Lampiran 8**). Hasil uji Tukey menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang nyata dengan kontrol yang ditandai dengan perbedaan notasi (**Tabel 5.1**). Pada tabel terlihat bahwa ekspresi VEGF pada kelompok kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) berbeda signifikan pada setiap Kelompok Perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 dapat dilihat pada **Tabel 5.1** bahwa terjadi perbedaan signifikan ($P < 0,05$) jika dibandingkan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi VEGF dibandingkan dengan kelompok (Tikus tua tanpa diberi perlakuan). Namun pada kelompok perlakuan 2 memiliki notasi yang berbeda signifikan terhadap kelompok (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi dari VEGF, sehingga kelompok perlakuan 2 memiliki dosis yang optimum untuk terapi yaitu 200 mg/kg BB.

Kelompok tikus kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) merupakan rata-rata paling rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar (7.8 ± 1.3 sel). Penurunan yang signifikan ini dikarenakan tikus yang berusia tua, sehingga dapat menurunkan ekspresi VEGF. Penurunan VEGF pada testis dikarenakan pada tikus usia tua mengalami penurunan produksi hormon estrogen. Estrogen memiliki peran dalam perkembangan dan menjaga fungsi reproduksi pada jantan.

Estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor. Reseptor α dan β (ER- α dan ER- β) merupakan reseptor estrogen. Peranan reseptor estrogen α dan β merupakan faktor mediasi dari estrogen untuk mengaktivasi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Cross *et al.*, 2003). VEGF merupakan faktor penting dalam angiogenesis yang dapat mengatur fungsi fisiologis dan patologis di dalam testis.

Penelitian menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dapat meningkatkan produksi hormon estrogen dalam tubuh yang berhubungan dengan peningkatan ekspresi VEGF. Hal ini sesuai dengan penelitian (Nugroho dkk, 2016) pada mentimun, flavonoid quercetin dapat membantu proses angiogenesis dengan merangsang *Hipoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) yang kemudian menginduksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sehingga dapat mempercepat proses angiogenesis. Sedangkan saponin dapat menstimulasi angiogenesis dengan meningkatkan produksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). VEGF juga berperan untuk menginduksi migrasi dan pertunasan sel endotel dalam pembentukan pembuluh darah baru melalui pengaturan beberapa reseptor integrin sel endotel (Destri dkk., 2017).

Setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam tiga dosis yang berbeda menunjukkan peningkatan ekspresi VEGF dibandingkan tikus putih usia tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Perbandingan antara ekspresi VEGF pada jaringan interstitial testis tikus usia tua setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (**Tabel 5.1**). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis

ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 100 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi VEGF menjadi (25.2 ± 2.0 sel). Perbedaan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi VEGF jaringan interstitial testis karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung zat yang berfungsi sebagai profertilitas. Hal ini sesuai dengan penjelasan Winarto (2003) bahwa tanaman pegagan memiliki berbagai bahan aktif meliputi ; a) triterpenoid saponin, b) minyak esensial, c) triterpenoid genin, d) flavonoid, e) fitosterol dan bahan aktif lainnya. Selain itu tanaman pegagan juga memiliki kandungan fitosterol yang bersifat androgenik yaitu membantu proses sintesis hormon testosteron pada hewan jantan.

Sedangkan pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis 200 mg/kg BB ekspresi VEGF mengalami peningkatan menjadi (59.8 ± 2.3 sel). Peningkatan ekspresi VEGF diduga terjadi karena senyawa fitosterol ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai prekursor steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian Hustasuhut (2014) bahwa senyawa fitosterol ekstrak etanol herba kemangi (*Ocimum americanum* L.) bekerja untuk mempengaruhi sel leydig memproduksi hormon testosteron, sehingga terjadi peningkatan produksi hormon testosteron. Hormon ini berfungsi dalam proses pembentukan spermatozoa melalui spermatogenesis di dalam testis serta di pematangan sperma di dalam epididimis. Senyawa-senyawa fitosterol yang terdapat pada tumbuhan antara lain sitosterol, kampesterol dan stigmasterol.

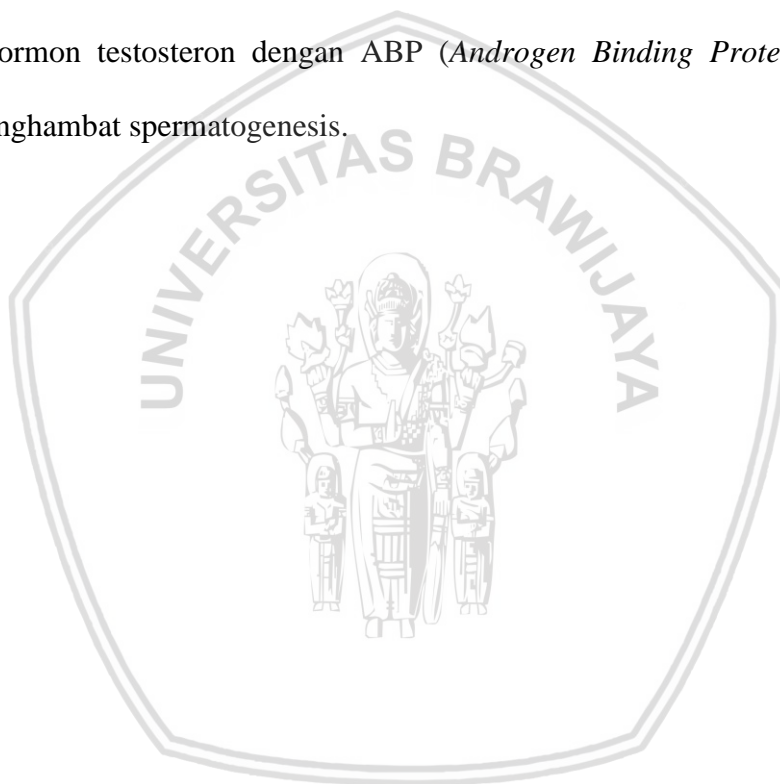
Tanaman pegagan memiliki kandungan senyawa fitosterol sebagai profertilitas yaitu untuk mempengaruhi sel leydig memproduksi hormon testostero. Senyawa fitosterol merupakan triterpena yang kerangka dasarnya cincin *siklopentana perhidrofenantrena*, kerangka dasar tersebut menyerupai kerangka steroid. Suatu bahan dapat bekerja sebagai hormone karena mengandung zat yang susunan molekulnya mirip hormon (Widiyani, 2006). Pada hewan jantan fitosterol mempengaruhi sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron. Hormon testosteron pada pejantan akan mengalami proses aromatisasi, yaitu perubahan testosteron menjadi estrogen oleh enzim aromatase melalui proses steroidogenesis. Hormon estrogen memiliki peran untuk menjaga fungsi fisiologis reproduksi setelah fertilitas pada pejantan. Hormon estrogen dapat bekerja apabila sudah berikatan dengan reseptor, reseptornya yaitu estrogen reseptor α dan estrogen reseptor β . Estrogen reseptor merupakan mediator dari estrogen untuk menginduksi VEGF, karena terdapat ERE (Estrogen Reseptor Elemen) yang merupakan pembawa transkripsi mRNA VEGF (Jehanara dkk, 2014).

VEGF berfungsi sebagai faktor penting dalam angiogenesis dengan merangsang protease endothel, proliferasi, dan migrasi sel (Basyar dan Sanif, 2014). Vaskularisasi di dalam testis dibutuhkan sebagai suplai darah yang berguna untuk mengatur suhu saat subur, memainkan peran penting dalam menjaga fisiologis dan patologis testis. Menurut Caireset *et al* (2009), di dalam testis VEGF dapat mempertahankan kelangsungan hidup sel-sel germinal pada proses pembentukan spermatozoa dengan menyuplai nutrisi, oksigen dan hormone. Peran dan regulasi dari VEGF dan reseptornya di testis, terutama dalam reproduksi

belum dipelajari. Namun VEGF dan reseptornya dapat memainkan peran penting terhadap fisiologi dan patologi yang terlibat dalam testis (Rudolfsson *et al.*, 2004).

Sementara pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis 300 mg/kg BB mengalami peningkatan menjadi (34.2 ± 0.8 sel). Pada kelompok perlakuan 3 ini mengalami peningkatan ekspresi VEGF dibandingkan dengan kelompok kontrol dan mengalami penurunan ekspresi VEGF dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB. Hal ini dikarenakan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dalam dosis yang tinggi akan menyebabkan peningkatan kadar testosteron dalam plasma karena senyawa fitosterol mempunyai struktur kimia yang sama dengan testosteron yaitu hidrokarbon berinti siklopentana perhidrofenantrena sehingga fitosterol akan diubah menjadi hormon testosteron. Suatu senyawa dapat bekerja sebagai hormon apabila memiliki struktur kimia dan molekul yang sama seperti hormon. Tingginya kadar hormon testosteron dalam tubuh akan mengakibatkan umpan balik negatif terhadap hipotalamus yang dapat menghentikan sekresi GnRH (*Gonadotrophins Releasing Hormon*), terhentinya sekresi GnRH akan menghambat sekresi gonadotropin (FSH dan LH) dan hipofisa anterior. LH berfungsi merangsang sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron, sedangkan FSH berfungsi merangsang spermatogenesis dan pembentukan ABP (*Androgen Binding Protein*) pada sel sertoli. Menurut Widiyani (2006) bahwa penggunaan senyawa steroid dengan dosis yang berlebihan akan mengakibatkan resiko infertilitas, penyusutan testikuler, pembengkakan prostat, oligospenia, kelainan hepar, peningkatan kadar kolesterol dan dapat menurunkan libido. Akmal dkk (2015) menyatakan bahwa

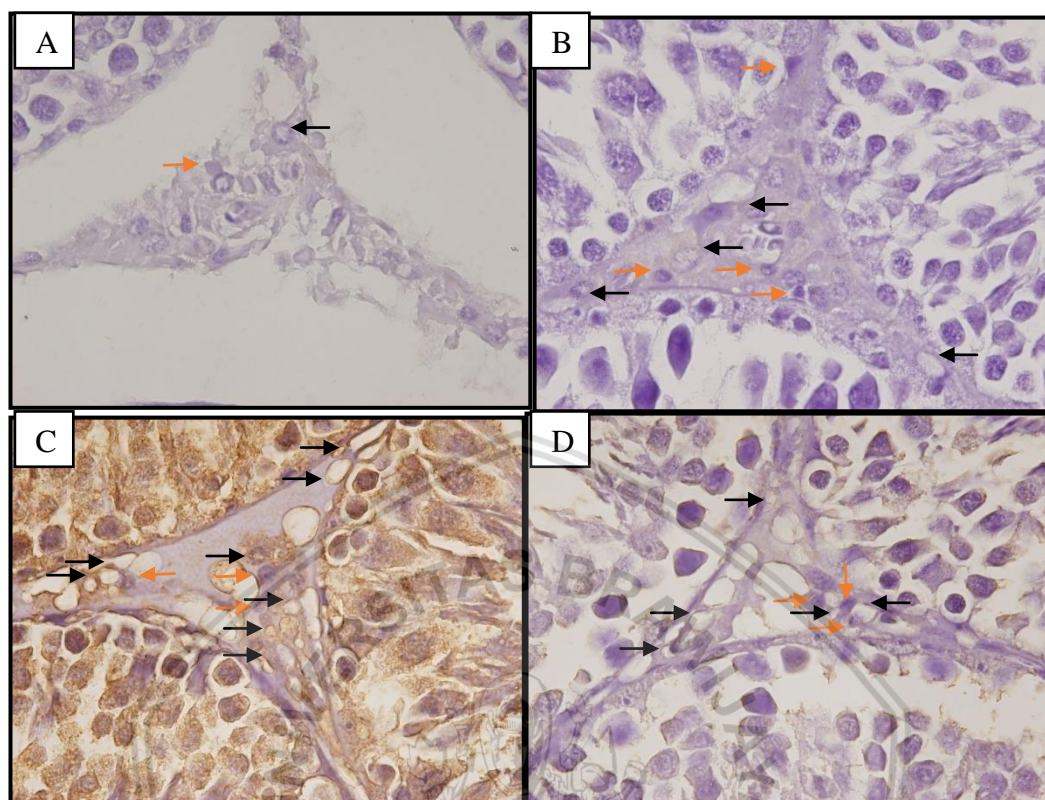
pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan pada dosis 250 mg/kg BB setiap hari selama 30 hari menunjukkan adanya penurunan terhadap konsentrasi hormon testosteron pada tikus putih jantan dibandingkan pemberian dosis 125 mg/kg BB. Hal tersebut berarti ada kecenderungan adanya anti androgenik pada daun pegagan yang mampu menghambat aksi hormon testosteron karena senyawa ini dapat menduduki reseptor testosteron. Anti androgenik dapat mencegah ikatan antara hormon testosteron dengan ABP (*Androgen Binding Protein*) sehingga akan menghambat spermatogenesis.



5.2 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi VEGFR-1 Jaringan Interstitial Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Hasil gambaran imunohistokimia dari ekspresi VEGFR-1 ditandai dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 dengan 20 kali lapang pandang pada area interstitial testis. Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan terhadap ekspresi VEGFR-1 pada jaringan testis tikus putih usia tua dapat diamati menggunakan metode imunohistokimia.

Ekspresi VEGFR-1 pada jaringan testis hewan coba kontrol mengalami penurunan pada keadaan tua, ditandai dengan sedikitnya bahkan hampir tidak ada area yang terwarnai coklat pada jaringan **Gambar 5.2.A.** VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*) mengalami penurunan pada saat kondisi tua akibat dari penurunan produksi estrogen yang dapat menginduksi penurunan VEGF dan diikuti VEGFR-1 melalui estrogen reseptor. Pada **Gambar 5.2.B** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 100 mg/kg BB, **Gambar 5.2.C** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 200 mg/kg BB, **Gambar 5.2.D** ekstrak etanol tanaman pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB intensitas penyebaran warna coklat pada ekstraseluler di daerah interstitial sel tampak lebih banyak terekspresi dibandingkan **Gambar 5.2.A** kontrol. Hal tersebut dikarenakan terjadi peningkatan produksi testosteron sehingga dapat menginduksi VEGF dan diikuti VEGFR-1 yang merupakan agen penting dalam vaskularisasi pada jaringan testis yang sebelumnya telah diberi ekstrak etanol tanaman pegagan.



Gambar 5.2 Hasil Imunohistokimia VEGFR-1 Jaringan Interstitial Testis (Dokumentasi Pribadi).

A = Kontrol (tikus tua tanpa pemberian ekstrak etanol pegagan),

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100 mg/kgBB),

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200 mg/kgBB),

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300 mg/kgBB),

Keterangan : → Ekspresi VEGFR-1

→ Sel Leydig

Kelompok kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) memiliki rata-rata ekspresi VEGFR-1 lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Ekstrak etanol tanaman pegagan (dapat meningkatkan ekspresi VEGFR-1 pada tikus tua yang ditunjukkan dengan perbedaan secara signifikan ($P < 0,05$)). Hasil akumulasi ekspresi VEGFR-1 dianalisis secara statistika menggunakan ANOVA dan menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) diantara perlakuan (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 Ekspresi VEGFR-1 pada Jaringan Interstitial Testis Tikus Tua Pasca Terapi dengan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi VEGFR-1 \pm SD (sel)
Kontrol	6.4 \pm 1.1 ^a
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	21.2 \pm 0.8 ^b
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	54.80 \pm 1.9 ^d
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	33.2 \pm 2.1 ^c

Pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa uji *One Way* ANOVA terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan dan ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi VEGFR-1 melalui produksi estrogen (**Lampiran 9**). Dari hasil penelitian, dapat diketahui rata-rata ekspresi VEGFR-1 tertinggi pada perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB yakni sebesar (54.80 \pm 1.9 sel). Dosis pada kelompok perlakuan 2 merupakan dosis optimum untuk terapi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Pada kelompok perlakuan 1 100 mg/kg BB kurang optimum karena ekspresi VEGFR-1 masih terekspresi sedikit dan hampir menyerupai perlakuan kontrol. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB terjadi penurunan ekspresi VEGFR-1 karena adanya senyawa toksik pada ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*).

Hasil uji Tukey (**Tabel 5.2**) menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang nyata dengan kontrol yang ditandai dengan perbedaan notasi. Pada tabel terlihat bahwa ekspresi

VEGFR-1 pada kelompok Kontrol (Tikus tua yang tidak diberi perlakuan) berbeda signifikan pada setiap Kelompok Perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 dapat dilihat pada **Tabel 5.2** bahwa terjadi perbedaan signifikan ($P < 0,05$) jika dibandingkan kontrol (Tikus tua yang tidak diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi VEGFR-1 dibandingkan dengan kelompok (Tikus tua yang tidak diberi perlakuan). Namun pada kelompok perlakuan 2 memiliki notasi yang berbeda signifikan terhadap kelompok (Tikus tua yang tidak diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dosis yaitu 200 mg/kg BB mampu meningkatkan ekspresi dari VEGFR-1, sehingga kelompok perlakuan 2 memiliki dosis yang optimum untuk dosis terapi.

Kelompok tikus kontrol (Tikus tua yang tidak diberi perlakuan) memiliki rata-rata paling rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar (6.4 ± 1.1 sel). Penurunan yang signifikan ini dikarenakan tikus yang berusia tua, sehingga dapat menurunkan ekspresi VEGFR-1. Penurunan VEGFR-1 pada testis dikarenakan pada tikus usia tua mengalami penurunan produksi estrogen. Estrogen memiliki peran dalam perkembangan dan menjaga fungsi reproduksi pada jantan. Estrogen dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor. Reseptor α dan β (ER- α dan ER- β) merupakan reseptor estrogen. Peranan reseptor estrogen α dan β merupakan faktor mediasi dari estrogen untuk mengaktivasi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Cross *et al.*, 2003) dan diikuti reseptornya seperti VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* - 1). Aktivasi

sinyal VEGF dimediasi oleh membrane spesifik pada reseptornya. Reseptor tersebut diaktivasi oleh VEGF dengan mencetuskan fosforilasi berbagai protein yang aktif dalam kaskade transduksi sinyal. VEGF dan reseptornya VEGFR-1 (Flt-1) sangat penting dalam regulasi dan memainkan peran penting dalam fisiologis vaskularisasi dan angiogenesis. Interaksi VEGF dan VEGFR menjadi salah satu dasar mekanisme dalam angiogenesis

Penelitian menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dapat meningkatkan produksi estrogen dalam tubuh yang berhubungan dengan peningkatan ekspresi VEGF dan VEGFR-1. Hal ini sesuai dengan penelitian (Nugroho dkk, 2016) pada mentimun, flavonoid quercetin dapat membantu proses angiogenesis dengan merangsang *Hipoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) yang kemudian menginduksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sehingga dapat mempercepat proses angiogenesis. Sedangkan saponin dapat menstimulasi angiogenesis dengan meningkatkan produksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Peningkatan VEGF ini akan merubah sinyal-sinyal intra dan interseluler, yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel-sel yang mengekspresikan vascular endothelial growth factor reseptor (VEGFR-1) dan VEGFR-2.

Setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam tiga dosis yang berbeda menunjukkan peningkatan ekspresi VEGFR-1 dibandingkan tikus putih usia tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Perbandingan antara ekspresi VEGFR-1 sel interstitial testis tikus usia tua setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol

tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (**Tabel 5.2**). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 100 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi VEGFR-1 menjadi (21.2 ± 0.8 sel). Perbedaan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi VEGFR-1 sel interstitial testis karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung zat yang berfungsi sebagai profertilitas. Hal ini sesuai dengan penjelasan Winarto (2003) bahwa tanaman pegagan memiliki berbagai bahan aktif meliputi ; a) triterpenoid saponin, b) minyak esensial, c) triterpenoid genin, d) flavonoid, e) fitosterol dan bahan aktif lainnya.

Sedangkan pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis 200 mg/kg BB ekspresi VEGFR-1 mengalami peningkatan menjadi (54.80 ± 1.9 sel). Peningkatan ekspresi VEGFR-1 diduga terjadi karena senyawa fitosterol ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai prekursor steroid yang dipicu dari peningkatan ekspresi VEGF. Peningkatan ekspresi VEGFR-1 dikaitkan dengan peningkatan ekspresi VEGF. VEGF mengaktifasi reseptornya dengan membentuk fosforilasi sehingga dihasilkan protein yang aktif, sehingga peningkatan VEGF dapat meningkatkan proliferasi sel-sel yang mengekspresikan *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR-1) dan (VEGFR-2) (Sourris *et al.*, 2008).

Senyawa fitosterol di dalam tanaman pegagan merupakan triterpena yang kerangka kimianya system cincin *siklopentana perhidrofenantrena*, kerangka dasar tersebut menyerupai kerangka steroid yaitu kolesterol. Senyawa triterpenoid

dapat meningkatkan senyawa steroid dalam darah, karena suatu bahan dapat bekerja sebagai hormon apabila memiliki kandungan zat dan molekul yang sama seperti hormon. Dengan demikian senyawa fitosterol diduga bersifat seperti hormon testosteron (Widiyani, 2006). Pada penelitian Yulinda (2014) menyatakan bahwa ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF. Hal ini dikarenakan ekstrak kacang tunggak memiliki kandungan genistein yang termasuk dalam kelas isoflavon dan mampu berikatan dengan estrogen reseptor dengan baik sehingga akan menstimulasi produksi VEGF. Peningkatan produksi VEGF akan memacu peningkatan proliferasi sel-sel pembentuk VEGFR-1 maupun VEGFR-2, sehingga dapat berikatan dengan VEGF untuk melakukan angiogenesis.

Pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis 300 mg/kg BB mengalami peningkatan menjadi (33.2 ± 2.1 sel). Pada kelompok perlakuan 3 ini mengalami penurunan ekspresi VEGFR-1 dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB dan mengalami peningkatan ekspresi VEGFR-1 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan pada dosis 300 mg/kg BB mempengaruhi penurunan ekspresi VEGF sehingga akan memicu penurunan ekspresi VEGFR-1. VEGFR-1 merupakan reseptor VEGF untuk menginduksi, diferensiasi, proliferasi dan migrasi sel endotel melalui ikatan reseptor (Abdullah dkk, 2009), sehingga penurunan VEGFR-1 dapat mengganggu VEGF bekerja untuk pembentukan pembuluh baru yang dapat menurunkan vaskularisasi pada jaringan testis. Vaskularisasi pada testis dibutuhkan untuk suplai darah yang berguna untuk mengatur suhu saat waktu subur.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan ekspresi VEGF pada jaringan interstitial testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian paling efektif yaitu 200 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan ekspresi VEGFR-1 pada jaringan interstitial testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian paling efektif yaitu 200 mg/kg BB.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan yaitu :

Perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai patofisiologi pemberian *Centella asiatica* terhadap proliferasi sel endothel pada hewan usia tua.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., R. Syahrul ., dan S. Isharyah. 2012. *Penilaian Respon Kemoterapi Kombinasi Paklitaksel-Karboplatin berdasarkan Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Serum pada Kanker Ovarium Epitelial*. Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanudin. Makasar.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta: Adabia Press. 4-5.
- Akmal, M., Aulanni'am, Widodo, M., Sumitro, B., and Purnomo, B. The Important Role of Protamine in Spermatogenesis and Quality of Sperm : A Mini Review. *Asian Pasific Journal of Reproduction*, 5(5) : 357-360.
- Akmal, M., M. Adam., M. Toras., Rusli., Rinidar., dan T.M. Lubis. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) Terhadap Konsentrasi Testosteron Pada Tikus Putih jantan (*rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria*. 9(1).
- Basyar, R., dan R. Sanif. 2014. Terapi Antiangigenik pada Kanker Ovarium. *MKS*. Th.46. No.1.
- Brinkhaus, B., Lindner., Schuppan, and Hahn. 2008. Chemical, Pharmacological and Clinical profile of The East Asian Medical Plant Centella Asiatica: *Review Asticle. Phytomedicine*, 7(5): 427-448.
- Caires, K.C., A.D. Jeanene., and M.J. Derek. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Germ Cell Survival During Establishment of Spermatogenesis in The Bovine Testis. *Reproductioni*. (138): 667-677.
- Campbell N.A., Mitchell L.G., Reece J.B., Taylor M.R., and Simon E.J. 2006. *Biology*, 5th ed. Benjamin Cummings Publishing Company.Inc. Redword City: England.
- Dai, J. and Rabie. 2007. VEGF : An Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J Dent Res*. 86(10): 937-50.
- Davidoff, M., R. Middendorff., D. Muller., A.F. Holstein. 2009. *The Neuroendocrine Leydig Cells and Their Stem Cell Progenitors, the Pericytes*. Springer Science & Business Media.

- Destri, C., I.K. Sudiana., dan J. nugraha. 2017. Potensi Ekstrak *Jatropha multifida* Terhadap Ekspresi VEGF Aphthous Ulcer *Rat norvegicus*. *Jurnal SainHealth*. 1(2): 5-12.
- Dilman, Vladimir et. al. Theories Of Aging. <http://www.antiagingsystems.com/ARTICLE-613/theories-of-aging.htm>. Diakses pada tanggal 15 Oktober 2010.
- Djuanda, S., E. Novianto., S.A. Boediardja. 2012. Peran Stres Oksidatif Pada Penuaan Kulit Secara Intrinsik. *MDVI*. 39(3): 127-133).
- Ekaputri, TW. 2014. *Efek Ekstrak Lda Hitam (Piper nigrum L.) Terhadap Libido Mencit (Mus musculus L.) Jantan yang Berbeda Umur*. [SKRIPSI]. Jurusan Biologi FMIPA. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Elyall, B. 2002. Pengaruh Infus Daun Puding (*Polyscias guifolei* L. H. Bayle) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan (*Rattus novergicus*) Galur DDY. *Jurnal Makara, Sains*. 6 (2): 99-104.
- Faranita, O. V. 2009. Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Fox, JG,. 2002. *Laboratory Animal Medicine* 2nd. Academic pr: New York.
- Gohil, K.J. 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Review Article* p546-556.
- Gunes, S., H.N.T. Gulgez., A.A. Mehmet., and A. Ramazan. 2016. Effects of Aging on The Male Reproductive System. *J Assist Reprod Genet*. (33): 441-454.
- Hau, J. and G. L. Hoosier Jr. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- Hayati, A., Mangkoewidjojo, S., Hinting, A., & Moeljopawiro, S. 2006. Hubungan Kadar MDA Sperma dengan Integritas Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus novergicus*) Setelah Pemaparan 2-Methoxyethanol. *Bek. Penel. Hayati*, 11, 151-154.
- Herawati, Y. 2014. *Pemberian Oral Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) Lebih Banyak Meningkatkan Jumlah Kolagen dan Menurunkan Ekspresi MMP-1 daripada Vitamin C pada Tikus Wistar (Rattus norvegicus) yang Dipapar Sinar UV-B*. [TESIS]. Denpasar: Universitas Udayana.

- Hoeben, A., Landuyt. B. Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T. and De Bruijn, E.A. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.* Vol 56, pp. 549-580.
- Hutasuhut, Riamayanti. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L.) terhadap Kualitas Sperma dan Densitas Sel Spermatogenik Tikus Sprague-Dawley Jantan Secara In Vivo [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas UIN Syarif Hidayatullah.
- Ihvaricci, A., I. Cahyo., dan U. Budiono. 2014. Perbedaan Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Serum pada Pemberian Ketorolak dengan Deksketoprofen Sebagai Analgesia Pasca Bedah pada Penyembuhan Luka. *Journal Anestesiologi Indonesia.* 6(2): 138-145.
- Irawan, R. H. W. 2012. Pengaruh Pemberian Yogurt Susu Kambing Sebagai Pencegahan untuk Hiperkolesterolemia melalui Pengamatan Malondialdedida (MDA) dan TNF- α pada Jantung Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*). *Journal of Universitas Brawijaya Malang.* 1-8.
- Jehanara., Sutrisno., dan S. Santoso. 2014. Pengaruh Genestein terhadap Penurunan Kadar Vascular Endothelial Growth Factor-A pada Kultur Sel Endometriosis. *Majalah Obstetri dan Ginekologi.* 22(02): 94-100.
- Jussila, L. and Alitalo. 2002. Vascular Growth Factors and Lymphangiogenesis. *Physiol Rev.* 82(3): 673-700.
- Kartiko, B., dan F. Siswanto. 2015. Hormon Dalam Konsep Anti Aging *Medicine. Jurnal Virgin.* 1(2): 108-122.
- Kormin, S. 2005. The effect of heat Processing on triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of herbal Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) Drink. (Tesis). Kuala Lumpur: Universiti Teknologi Malaysia.
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat.* San Diego, CA : Academic Press. Hal 150-152.
- Lusiana, F. Dhafir, dan Masrianih. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur DDY. *Journal E-Jipbiol.* Vol. 2: 24-29, Desember 2013
- Maula, I.F. 2014. Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley secara In Vivo. [SKRIPSI]. Program Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah: Jakarta

- Nugroho, AM., U. Elfiah., R. Normasari. 2016. Pengaruh Gel Ekstrak dan serbuk Mentimun (*Cucumis sativus*) terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luk Bakar Derajat IIB pada Tikus Wistar. *E-journal Pustaka Kesehatan*. Vol: 4, No: 3.
- Olsson, A.K., A. Dimberg., J. Kreuger., and C. Lena. 2006. VEGF Receptor Signalling – in Control of Vascular Function. *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*. 7: 359-371.
- Pangkahila, JA. 2013. Pengaturan Pola Hidup dan Aktivitas Fisik Meningkatkan Umur Harapan Hidup. *Sport and Fitness Journal*. 1(1): 1-7.
- Papparella, A., F. Nino., C. Noviello., M. Romano., S. Papparella., O. Paciello., and A.A. Sinisi. 2013. Morphologic Changes Due to Human Chorionic Gonadotropin in The rat testis: Role of Vascular Endothelial Growth Factor. *Open Journal of Pediatrics*. 3: 85-91.
- Prior, R. 2003. Fruits and vegetables in The Prevention of Cellular Oxidative Damage. *Arkansas. Am. J. Clin. Nutr.* Vol.78: 570S-8S.
- Rudolfsson, S., P. Wikstrom., A. Jonsson., O. Collin., and A. Bergh. 2004. Hormonal Regulation and Functional Role of Vascular Endothelial Growth Factor A in The Rat Testis. *Biology of reproduction*. 70: 340-347.
- Saerang, J. 2013. Vascular Endothelial Growth Factor Air Mata sebagai Faktor Risiko Tumbuh Ulang Pterygium. *J Indon Med Assoc*. Vol:63, No:3.
- Salamah, N., dan Nurushoimah. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol herba Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb.) Dengan Metode Penghambatan Degradasi beta-Karoten. *Farmasains*. Vol: 2. No: 4.
- Samiasih, A. 2010. *Perbedaan Ekspresi VEGF Sel Adenokarsinoma Kolorektal Tikus Sprague Dawley dengan dan tanpa Pemberian Ekstrak Phyllanthus niruri*. [TESIS]. Magister Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Samson, E. Dan A. J. A, Unility. 2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (Ig A) pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran.
- Shibuya, M. 2006. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1 Flt-1): A Dual Regulator for Angiogenesis. *Angiogenesis*. 9(4): 225-230.

- Shiraishi, K and Naito. 2008. Involvement of vascular endothelial growth factor on spermatogenesis in testis with varicocele. *Fertility and Sterility*, Vol.90: 1313-1316.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Press. Washington.
- Soejono, C. H. 2004. Pasien Geriatri dan Permasalahannya. *Artikel Medika*. no. 5 tahun XXX, Mei 2004.
- Solihati, N. 2013. *Antifertiitas Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) dan Reversibilitas Fungsi Reproduksi pada Tikus (Rattus novergicus) Jantan*. [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sugianto, I., Subandi., dan Muntholib. 2013. *Uji Fitokimia Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) dan Buah Sirsak (Annona muricata L.) Serta Potensinya Sebagai Inhibitor Enzim Oksidasi*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Negeri Malang.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Malang: UB Press.
- Svingen, T., and P. Koopman. 2013. Building the Mammalian Testis: Origins, Differentiation, and Assembly of Component Cell Populations. *Genes and Development*. 27: 2409-2426.
- Tjipto, B.W. 2010. *Kajian Terapi Akupunktur Terhadap Kadar Hormon Testosteron Pria Usia Lanjut*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sistem dan Kebijakan Kesehatan. Surabaya.
- Widiyani, Tetri. 2006. Efek Antifertilitas Ekstrak Akar Som Jawa (*Talinum paniculatum Gaertn*) Pada Mencit IMus musculus) Jantan. *Bul. Panel. Kesehatan* 34(3): 119-128.
- Wilkinson, JM., S. Halley and P.A Towers. 2000. Comparison of mle reproductive Parameters in Three rat Strains: Dark Agouti, Sprague Dawley and Wistar. *Laboratory Animals*. (34): 70-75.
- Winarto, W. R. Dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yulinda, D. 2014. *Efek Pemberian Ekstrak kacang Tunggak (Vigna unguiculata) terhadap Ekspresi VEGF Endotel, ketebalan Intima-media dan Diameter Lumen Aorta Pada Tikus Hipoestrogen*. [TESIS]. Program Studi Magister Kebidanan. Fakultas kedokteran. Universitas Brawijaya.